11860(7)

29-32

动物学研究 1994, 15 (3): 29—32　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research

斜鳞蛇核型高分辨显带及减数分裂的观察

王蕊芳　贺维顺
（中国科学院昆明动物研究所　650223）

Q959.620.3

A

摘要　本文报道了斜鳞蛇(*Pseudoxenodon macrops*)的核型和银带。二倍体数目 2n＝36，其中包括 8 对大染色体(6 对中着丝粒染色体，2 对亚中着丝粒染色体)和 10 对小染色体。其核仁组织区(NORs)位于第 1 对小染色体末端。并采用 TdR-BrdU 处理方法，显示斜鳞蛇复制带，实验证明，用大剂量的胸腺嘧啶核苷(TdR)阻断细胞周期，再以 BrdU 渗入 S 期细胞中复制的染色体区域，并显示带纹。同时还对斜鳞蛇的减数分裂进行了观察。

关键词　斜鳞蛇，核型，银带，复制带，减数分裂　染色体组型

我省地形、地貌多种多样、气候复杂、物种多样性以及与此相关联的遗传多样性十分丰富。种内遗传多样性的保持有助于保持物种和整个生态系统的多样性。我省动物种类丰富，仅爬行类占全国种类 45% 左右。研究其染色体是遗传多样性范围之一。

斜鳞蛇(*Pseudoxenodon macrops*) 属游蛇亚科(Colubrinae)斜鳞蛇属。国外分布于尼泊尔、印度、越南，国内广泛分布于福建、广西、湖南、湖北、四川、贵州、云南等地(浙江医科大学等，1980)。

目前，有关蛇类染色体研究工作国内外报道较少，尤其带型的显示更为困难，因此，至今蛇类染色体研究工作难以进一步深入。据我们查阅的资料，有关斜鳞蛇的核型和带型国内外现尚未见报道。本文对斜鳞蛇的染色体、带型和减数分裂作初步观察分析，以期对探索蛇类分类、系统发生和种类分化提供新的线索。

1　材料和方法

实验动物：2♂♂，采自昆明西郊花红洞。

1.1 细胞培养及染色体制备

1.1.1 培养基组成　80% RPMI 1640 + 20% 小牛血清 + 双抗。

1.1.2 细胞培养及染色体制备　在无菌条件下，取出动物心脏，以含有双抗的磷酸盐平衡液 (PBS) 洗若干次，在培养基中剪碎，贴壁、放于 26℃ 培养箱中培养，细胞传若干代后待用。传代细胞培养 96 h 加秋水酰胺溶液，最终浓度为 0.04 μg / ml，继续培养 12—13 h，常规空气干燥法制片，10% Giemsa 染色 15 min。观察摄影后标本以固定液褪色，

本文 1993 年 8 月 7 日收到，同年 12 月 2 日修回

按 Howell 和 Black (1980)快速银染法制备 NORs。

1.2 高分辨显带方法

1.2.1 传代细胞培养 96 h、以大剂量 TdR 阻断细胞的复制，TdR 的最终浓度为 0.5 mg／ml，阻断 17—20 h 后、用 Ringer 液洗涤细胞两次，换入培养基，并加入 BrdU，最终浓度为 30—50μg／ml，继续避光培养 7—8 h，终止培养前 2 h 加秋水酰胺(最终浓度为 0.04 μg／ml)。空气干燥法制片。

1.2.2 显带步骤 上述制片在室温下至少避光放置 24 h 后，将玻片放入盛有 1×SSC 溶液的培养皿中，制片的表面盖上一张擦镜纸，用 1×SSC 液将其湿润，放于 20 W 紫外灯光下垂直照射 20—30 min，溶液的温度控制在 40℃左右，照射后制片以 5% Giemsa 液染色 8 min。

1.3 减数分裂染色体标本制备

取出动物睾丸，在 0.4% KCl 溶液中剪碎，室温下低渗 25—30 min，空气干燥法制片、10% Giemsa 染色 10 min。

2 结果

2.1 核型

本实验共观察 120 个中期分裂相，其中 2 n＝36 占观察总数的 83%，从而确定斜磷蛇 2 n＝36，其中大染色体 8 对，小染色体 10 对，大染色体中除 Nos. 2，6、8 为亚中着丝粒染色体，其它均为中着丝粒染色体(图版Ⅰ：A，a)，有一对核仁组织区(NORs)，位于第 1 对小染色体末端(图版Ⅰ：B，b 箭头所示)。

2.2 高分辨复制带

标本经 TdR 和 BrdU 处理后，斜磷蛇的大部分染色体都明显伸长，染色体长短适合的分裂相均能显出细致的带纹，大部分集中在大染色体上，而小染色体上带纹甚少。从图版Ⅰ：C 可以看到各染色体以下特征：No. 1 最大一对中着丝粒染色体，一般显示有 16—18 条深带，着丝粒为浅染。No.2 最大一对亚中着丝粒染色体显示 14—16 条深带，着丝粒深染。No.3 着丝粒浅染，有 10—12 条深带。No.4 着丝粒深染，有 8—10 条深带。No.5 有 6—8 条深带，着丝粒浅染。No.6 有 6 条深带，着丝粒浅染。No.7 着丝粒深染，有 4—5 条深带。No.8 着丝粒浅染，有 4 条深带。各染色体由于长度不同，带纹的数目相差亦较大，随着染色体长度增加，带纹数目也增加，小染色体上就很少显示带纹。

2.3 减数分裂

斜磷蛇的精母细胞减数分裂亦与其它动物相似，分为细线期、偶线期、粗线期、中期等各时期。在细线期可见染色体呈细长的线状结构，在这种细线的局部可见念珠状的小圆珠，称为染色粒(chromomeres)。偶线期时同源染色体开始配对。在双线-终变期通常可见 8 个双价体，其中大的双价体都产生交叉，染色体长度较长的交叉数目也较多（图版Ⅱ：A-F)。

3 讨论

关于斜鳞蛇的核型，据我们查阅的文献，尚未见有报道，而有关游蛇科的染色体曾有不少学者作过研究(Becak，1969；Gorman，1973；Bickham，1984；Toriba，1990)。该

科二倍体数目变化较大，最高的 2n=50 (*Cletia occipitalutea*)，最低的为 2n=24 (*Hydrodynastes bicinetus schultzi* 和 *H. giges*)。但较常见的则为 2n=36（其中 16 macro 和 20 microchromosomes），说明游蛇科的核型比较保守，在进化过程中属于较稳定的类群。据某些学者阐述(Bickham，1984；Gorman，1973；Peccinin，1981；Mengden 等，1980)。游蛇科在蛇类中属较高等类群、原始蛇类核型大多数 2n 高于 36，多数为端着丝粒染色体，且大小染色体形态没有区别。通过罗伯逊易位使二倍体数目和大小染色体形态发生变化。说明斜鳞蛇在蛇类中亦属较高等的类群。

有关爬行类染色体，国内外学者已做了不少工作，但在带型方面的研究目前还很少。Donnellan (1991) 曾报道了 25 种 Scincidae 的染色体核型、C 带和 NORs，发现大多数种类 NORs 都位于最大 1 对小染色体末端。斜鳞蛇 NORs 的分布区域亦与其相同。Donnellan (1991) 认为，此类型 NORs 在低等脊椎动物进化过程中，是倾向保守的。

在制备斜鳞蛇复制带过程中，我们曾使用胰酶、BrdU 等不同方法处理，未能获得带型，最后采用 TdR-BrdU 方法才得到较理想的复制带。我们推测，蛇类亦可能与鱼类、两栖类相似，具有较高含量的 DNA，染色体间距离小，从而使爬行动物带型研究比其他动物较为逊色。据 Yunis(1976)阐述，培养 3 d 后的淋巴细胞(本实验为 4 d)加入 TdR 使之不能进入合成期，而聚集于 G_1 与 S 期之交，从而达到同步化。再用 BrdU 渗入 S 期细胞，使染色体拉长，被 BrdU 替代的染色体片段染成淡兰色，而与 TdR 结合的片段则成暗红色。在 DNA 复制时有 BrdU 渗入，并利用 BrdU 和胸苷不同的色差特性而显示的带可称为 BrdU 复制带(衡红强，1984)。所以，本文采用的高分辨显带法应归于复制带范畴。

应用复制带技术，在斜鳞蛇染色体上获得了深浅相间的带纹，它们是基本稳定的，这将对探讨蛇类种间可能存在染色体带型上的差异和探明各种间的亲缘关系、起源和进化提供细胞遗传学依据。

Gorman (1973) 和 Bickam (1984) 研究了游蛇科若干种蛇的染色体，发现性染色体通常位于第 4 对大染色体，雌性为 ZW 型。因本实验材料为雄性，故未见有 ZW 异型性染色体。

致谢 本文承刘万兆协助鉴定标本、吴世芳参加部分工作，谨此致谢。

参 考 文 献

浙江医科大学等，1980. 中国蛇类图谱，97—99

衡红强，1984. 日本林蛙染色体高分辨 R 带的研究. 两栖爬行学报，3(2)：55—58.

Becak W *et al*, 1969. Cytotexonomy and chromosomal evolution in Serpents. *Cytogenetics*, **8**: 247-262.

Bickham J W, 1984. Patterns and modes of chromosomal evolution in Reptiles. CRC Press, **2**: 25-28.

Donnellan S C, 1991. Chromosomes of Australian lygosomine skinks. *Genetica*, **83**: 207-222.

Gorman G C, 1973. The chromosomes of the Reptilia, a cytotaxonomic interpretation, In Chiarelli A B and Capanna E eds, Cytotaxonomy an Vertebrate Evolution. New York: Academic Press, chapter 12: 25-34

Howell W M, D A Black, 1980. Controlled silver staining of nucleus organizer regions with a protective colloidal

developer: 1-step method *Experientia*, **36**: 1014-1015.

Mengden G A, Stock A D, 1980. Chromosomal evolution in Serpentes: A comparison of G and C chromosome banding patterns of some colubrid and boid genera. *Chromosoma*, **79**: 53-64.

Peccinini-Seale D. 1981. New developments in vertebrate cytotaxonomy, Ⅳ. Cytogenetic studies in reptiles, *Genetica*, **56**: 123.

Toriba M, 1990 Karyotypes of some species of Japanese colubrid snakes. Cytogenetics of Amphibians and Reptiles, 255-266.

Yunis J J, 1976 High resolution of human chromosomes. *Science*, **191**: 1268-1270.

STUDY ON THE KARYOTYPE, HIGH RESOLUTION BANDING MEIOSIS OF *Pseudoxenodon macrops* (SNAKE)

Wang Ruifang He Weishun

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica* 650223)
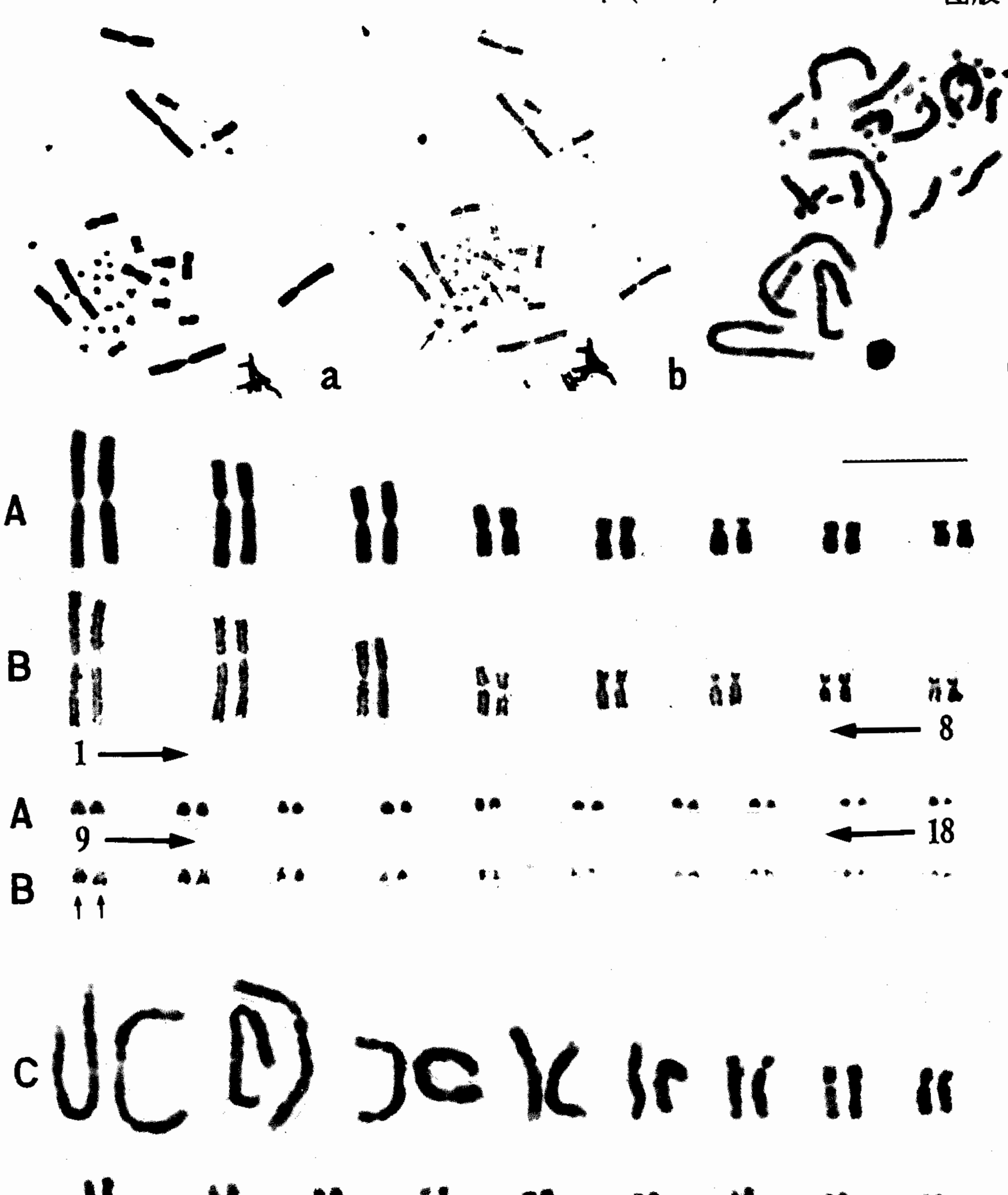
Abstract

The mitosis and meiosis of *Pseudoxenodon macrops* had been investigated, using conventional Giemsa and silver staining and BrdU induced condensation inhibition. The diploid number is 2 n = 36 with 16 macro- and 20 microchromosomes (macro autosomes are 10 metacentric and 6 submetacentric). Silver staining NORs were localized on the microchromosomes pair No.1.

The high resoluting banding of *Pseudoxenodon macrops* is sucessfully made by blocking the cycle of cell with large dosage of TdR and incoporating BrdU into the replicating chromosomal DNA during synthesis phase. These banding patterns allow for the first time a precise identification of all macro-chromosomes and the analysis of the patterns of replication in the various stages of S-phase in snake. This information could clarify the taxonomic and phylogenetic relationships among certain familes of colubrinae as well as the evolutionary relationships within certain families.

Key words *Pseudoxenodon macrops*, Karyotype, High resolution banding, Ag-NORs, Meiosis

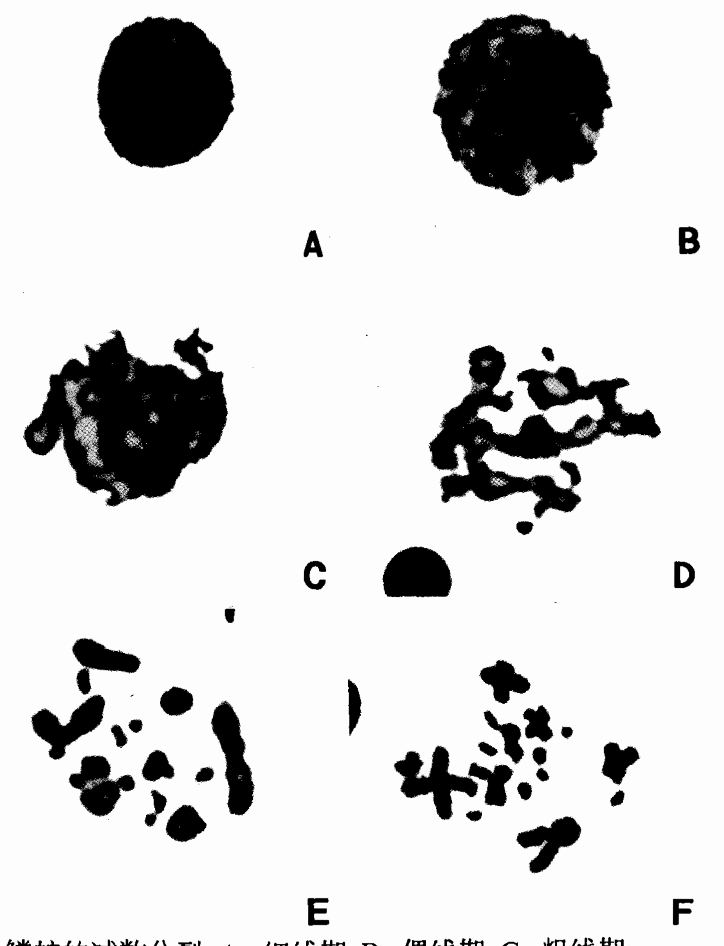
图版 I



斜鳞蛇的核型:

A. a. 吉姆萨染色; B. b. 银染色核型 (箭头示 NORs); C. c. 高分辨带核型

 图版 II



斜鳞蛇的减数分裂: A. 细线期; B. 偶线期; C. 粗线期; D. 双线期; E. 终变期－中期 I; F. 中期 II